

BUNDESPRÄSIDENT DEUTSCHLAND

REC'D 08 DEC 2003

WIPO PCT



PA/DE03/03149

H2

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 44 863.9

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Anmeldetag:

23. September 2002

Anmelder/Inhaber:Mogen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs
GmbH, Berlin/DE**Bezeichnung:**Impfstoff gegen Infektionen mit Onkoviren, wie dem
feline Leukosevirus der Katze**IPC:**

C 12 N, A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

PAUST



X

Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH
Fabeckstr. 30

14195 Berlin

5

10

**Impfstoff gegen Infektionen mit Onkoviren, wie dem feline
Leukosevirus der Katze**

15 Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Impfstoff auf DNA-Basis, durch den Katzen gegen Infektionen mit dem feline Leukosevirus geschützt werden können.

Das feline Leukosevirus (FeLV) ist ein katzenspezifisches, weltweit verbreitetes Virus, das Auslöser schwerer Erkrankungen ist, und zu den Haupttodesursachen der feline Population zählt. Derzeit besteht eine Infektionsrate von 12% bis 16% der Katzen sowohl in Europa als auch in den USA.

Ein Teil der Katzen kann die Infektion überwinden; es ist im Gegensatz dazu jedoch auch eine lebenslange Viruspersistenz im Organismus möglich. Latent infizierte Katzen gelten dann als Erregerreservoir.

25 Eine wirksame Therapie von FeLV-Infektionen, die zu einer Heilung führt, ist zur Zeit nicht möglich. Bestenfalls gelingt ein Zurückdrängen der Krankheit für eine gewisse Zeit. Bestimmte Chemotherapeutika sind auch bei der Katze anwendbar, die

Nebenwirkungen sind jedoch wie in der Humanmedizin hochproblematisch. Noch im Versuchsstadium befindet sich die Behandlung mit Interferonen.

Virostatika sind nicht in der Lage, das Virus zu inaktivieren und führen damit ebenfalls zu keinem Heilerfolg.

- 5 Eine wirksame Bekämpfung von FeLV-Infektionen kann nur vorbeugend durch Impfung erreicht werden.

Stand der Technik

Derzeitig erhältliche Impfstoffe gegen FeLV beruhen entweder auf inaktivierten FeLViren, auf rekombinant hergestellten Proteinen, sogenannten Subunit-Vakzinen,

- 10 oder auf dem Einsatz von genetisch modifizierten Lebendvakzinen. Allerdings weisen diese Arten von Impfstoffen neben unzureichendem Impferfolg eine Reihe weiterer Nachteile auf.

So führen Zubereitungen aus inaktivierten Viren nur bei einem Teil der geimpften Tiere zur erwünschten Immunität. Bei diesen Impfstoffen handelt es sich

- 15 immer um Proteingemische, in denen hochimmunogene Antigene mit einer großen Menge anderer Proteine um die Präsentation durch das Immunsystem "konkurrieren" müssen. Zudem können nach erfolgter Impfung starke Nebenwirkungen, wie allergische Reaktionen und Autoimmun-Erkrankungen, auftreten.

- 20 Ein rekombinanter Impfstoff, der aus biotechnologisch hergestelltem Hüllprotein des FeLV besteht und mit Aluminiumhydroxid und Saponin adjuvantiert ist, ist derzeit ein häufig eingesetzter Impfstoff. Impfungen mit dieser Vakzine führen bei 80 bis 95% der Katzen zum Schutz gegen Leukose. (Lutz et al., 1991, J Am Vet Med Assoc;199(10):1446-52).

- 25 Problematisch ist jedoch das Risiko des Auftretens von Fibrosarkomen an der Impfstelle. Ein weiterer Nachteil dieses Impfstoffes ist, daß die erwirkte Immunität hauptsächlich auf der Bildung virusneutralisierender Antikörper beruht. Neuere Untersuchungsergebnisse (Flynn et al., 2000, Immunology 101, 120-125) zeigen jedoch, daß zur Ausbildung einer schützenden Immunität die zelluläre Immunantwort ebenfalls von sehr großer Bedeutung ist.

Der Einsatz von Lebendvakzinen hat sich zwar hinsichtlich der erzielten Immunität als effektiv erwiesen; birgt jedoch die ständige Gefahr in sich, daß sich die

- verwendeten Virusstämme durch Mutation oder Rekombination zu neuen pathogenen Virusstämmen entwickeln. Ebenso muß beachtet werden, daß bei der Anwendung von solchen Impfstoffen, die sämtliche Virusstrukturen enthalten, sich auf Grundlage des Antikörperstatus nicht mehr unterscheiden läßt, ob die Tiere
- 5 infiziert oder immunisiert sind. Aus diesen beiden Gründen eignen sich diese Impfstoffe nicht für die Praxis.
- Ein weiteres Beispiel für eine aus infektions- oder replikationsfähigen Viren bestehende Vakzine ist ein rekombinantes, FeLV-Oberflächenproteine exprimierendes Kanarienpockenvirus. In Testinfektionen konnten 83% der Tiere
- 10 vor der Infektion geschützt werden (Jarrett et al., 1993, J of Virology: 2370-2375). Allerdings weist dieser Impfstoff die Nachteile einer Lebendvakzine in bezug auf unvorhersagbare Rekombinationen auf, weiterhin ist er relativ aufwendig und damit teuer herzustellen und zu charakterisieren.
- Neben solchen klassischen und modernen rekombinanten Impfstoffen gibt es die
- 15 Möglichkeit der Impfung mit DNA-Expressionskonstrukten. Dabei wird nur die Information für bestimmte immunogene Teile des Erregers in Form von DNA dem Impfling verabreicht. Nach Impfung werden die FeLV-Antigene von den Zellen der geimpften Katze exprimiert, und stimulieren so eine Immunantwort gegen das Virus.
- Diese Möglichkeit, durch Injektion von Antigen kodierenden DNA-
- 20 Expressionskonstrukten eine Immunantwort gegen dieses Antigen zu erzielen, ist zuerst von Tang und Ulmer für die Maus publiziert worden (Tang et al., 1992, Nature 365, 152-154; Ulmer et al., 1993 Science 259, 1745-1749) und seither in einer grossen Menge von Spezies gezeigt worden. Es ist anzunehmen, daß das generelle Prinzip der Impfung mit Immunogen-kodierenden Nukleinsäuren auf alle höheren
- 25 Tiere übertragbar ist. Hinsichtlich der Wahl geeigneter Antigene, deren Kodierung in Nukleinsäuresequenzen sowie der Wahl des geeigneten Impfregimes stellen sich dem Fachmann für jede Anwendung eine Reihe zum Teil nur schwer überwindbarer Probleme, was dazu geführt hat, daß bisher noch keine Vakzine auf DNA-Basis in eine Erprobung in der klinischen Phase 2 oder 3 aufgenommen wurde.
- 30 Die Impfung von Katzen mit Expressionskonstrukten zur Expression der Gene "env" und "gag" ist in der französischen Patentschrift FR 2 751 223 beschrieben. Die dort skizzierte Erfindung ist allerdings nicht ausreichend offenbart, so sind keinerlei Expressions- und Immunisierungsversuche oder deren Ergebnisse gezeigt.

Offenbar handelt es sich um eine spekulative Anmeldung, der keine erfinderische Arbeit zugrunde lag.

Versuche zur DNA-Immunisierung auf dem Gebiet des FeLV, die allerdings nicht zu einem überzeugenden Erfolg führten, sind bekannt (Jarrett et al., 2000 Immunology 101, 120-125). In der vorzitierten Arbeit war das Gesamtgenom mit einer Polymerasedeletion als Expressionskonstrukt inokuliert worden. Der klinische Erfolg der Impfung schlug sich allerdings nicht in einem Schutz der Katzen vor Infektion und Virämie nieder. Neben diesem praktischen Nachteil des zitierten Impfversuchs hat die Verwendung von Deletionsmutanten oder deren Genom zur Impfung den Nachteil, daß die Gefahr besteht, daß aus einem deletierten Virus durch Rekombination mit endogenen oder exogenen Virussequenzen infektiöse, neuartige Pathogene entstehen.

Im Gegensatz zu der zitierten Arbeit von Jarrett war das Ziel der Bemühungen der vorliegenden Erfindung, nur isolierte Antigene des FeLV zur Expression zu bringen. Vorversuche zeigten allerdings, daß durch Inokulation von Expressionskonstrukten, die homologe Wildtyp-Sequenzen des "env"- und "gag"-Gens des FeLV unter Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) early-immediate Promotors kodierten, keine Antikörperproduktion in Katzen provozierbar war. Weitere Versuche zeigten ebenfalls, daß die betreffenden Sequenzen in menschlichen und aus Katzen gewonnenen Zelllinien nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert wurden. Dieses Phänomen ist für Sequenzen des HI-Virus sowie andere Lentiviren bekannt (Wagner et al., 2000, Hum Gene Ther 11(17), 2403-2413). Die Expression der Wildtypsequenzen in der infizierten Zelle ist dabei abhängig von der vorhergehenden Expression des viral kodierten Proteins "rev".

Die Expressionskontrolle des nicht zur Klasse der Lentiviren gehörenden Retrovirus FeLV ist unbekannt und ein der "rev"-Kontrolle ähnlicher Mechanismus nicht gezeigt oder in der Literatur postuliert worden.

Ebenfalls bekannt ist, daß durch Optimierung der Kodonbenutzung (Codon Usage Optimization) innerhalb des Expressionskonstrukttes an die präferentiell in Säugern benutzten Kodons die Expression von Proteinen erheblich gesteigert werden kann (Grantham et al., Nucleic Acids Res 1980, 9:1893-912). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Expressionssteigerung verschiedener viraler Strukturproteine des HIV-1 und SIV angewandt. Der Effekt beruht auf der Umgehung der "rev"-

- abhängigen Transportwege für das extrem AT-reiche Transkript dieser späten Proteine im Replikationszyklus der Lentiviren. So gelang es durch Kodonoptimierung der DNA Sequenzen des „env“ und des „gag“ Proteins des menschlichen HI-Virus, weitaus höhere Antikörpertitre gegen diese synthetischen
- 5 Antigene in Mäusen zu erzielen, als es durch die Wildtypsequenzen möglich war (Haas et al., 1998, J Virol. 72: 1497-503, Wagner et al., Hum Gene Ther. 2000, 17:2403-13). Die Herstellung und der Gebrauch solcherart optimierter Sequenzen zur Vakzinierung gegen HIV-1 ist auch bekannt aus der WO 00/029561 und der WO 97/48370.
- 10 Ein anderes Problem besteht in der Applikation der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA. Ein Nachteil der im Moment zum DNA Transport (Transfektion) verwendeten Vektoren besteht darin, daß entweder Vektoren viralen Ursprungs eingesetzt werden, die vom Aspekt der Sicherheit Probleme aufwerfen (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518), oder aber Plasmide genutzt werden. Da
- 15 Plasmide durch bakterielle Fermentation gewonnen werden, enthalten sie neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA sowie üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Die Problematik wird in der WO 98/21322 ausführlich diskutiert. Erwähnt sei, daß bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von
- 20 Plasmid-DNA das inhärente Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei großangelegten Schutzimpfungen nicht vertretbar ist, besteht.
- Eine andere Art von DNA-Vektor sind kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte, wie sie in der EP 0 914 318 B1 offenbart werden. Insbesondere deren
- 25 Anwendung in Form von peptid-gekoppelten DNA-Konstrukten führt zu einer überraschenden, qualitativ verbesserten Immunantwort im Vergleich zu unmodifizierter Plasmid-DNA (siehe auch DE 101 56 679.4 und DE 101 56 678.6.). Neben den Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfermethoden bedingt sind, ist es bisher nicht gelungen, einen effektiven und sicheren Impfstoff gegen FeLV zu
- 30 entwickeln. Bis heute beschränkt sich die Behandlung einer FeLV-Infektion auf die Stärkung der Abwehrkräfte der Tiere und die Behandlung der Begleit- und Sekundärinfektionen. Die vorhandenen Impfstoffe bringen die eingangs genannten Nebenwirkungen mit sich.

Ausgehend von diesem Stand der Forschung ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen, der zu zellulärer und humoraler Immunität gegen ausgewählte Antigene des FeLV in Katzen und einem Schutz vor Infektionen mit FeLV führt und den Sicherheitsaspekt berücksichtigt. Zusätzlich soll 5 auf herkömmliche Adjuvantien verzichtet, und damit die Gefahr der Fibrosarkombildung an der Injektionsstelle ausgeschlossen werden können. Weiterhin war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Expressionskonstrukte bereitzustellen, die zur Expression von Antigenen des FeLV in Säugerzellen in messbaren Mengen führen.

10 **Lösung der Aufgabe und Vorteile der Erfindung**

Erfindungsgemäß wird dieses Ziel dadurch erreicht, daß Katzen mit einem Gemisch (Cocktail) aus synthetisch hergestellten, kodon- und spleiß-Signal-optimierten DNA-Sequenzen immunisiert werden, die für Strukturproteine ("gag"), sowie das wichtigste Membranprotein ("env") des FeLV kodieren.

15 Die Gensequenz "gag" kodiert für die viralen Strukturproteine der inneren Virusverpackung, die Gensequenz "env" für die viralen Hüllproteine. Das Protein, das die höchste Immunogenität der in der "env" Sequenz kodierten Proteine besitzt, ist das Glycoprotein gp70. Gegen das gp70 werden im Katzenorganismus virusneutralisierende Antikörper gebildet. Diese Antikörper stellen die erste 20 Immunantwort nach dem Eindringen des Erregers in den Körper dar, die unter Umständen schon ausreichend zur Überwindung der Infektion sein kann.

Ob membranständige oder sekretorische Proteine besser geeignet sind, virusneutralisierende Antikörper zu induzieren, wird kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene für "env" kodierende Konstrukte 25 hergestellt. Da bekannt ist, daß die p15 Sequenz der "env" Gensequenz mindestens einen immunmodulatorisch wirksamen Sequenzabschnitt enthält, der die Antikörperbildung unterdrückt (Haraguchi et al., 1997, Journal of Leukocyte Biology, 61, 654-666), wurde neben einem Konstrukt kodierend für gp70 und p15 (gp85), ein weiteres hergestellt, welches nur das gp70 enthieilt und damit zur Expression des 30 sekretorischen "env" Proteins ohne Transmembranteil führt.

Eine Vakzine, die sowohl virusneutralisierende Antikörper gegen das gp70, als auch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren kann, stellt demnach eine deutliche

Verbesserung gegenüber den bisher erhältlichen Impfstoffen dar und könnte gegebenenfalls auch zur Therapie infizierter Katzen eingesetzt werden.

- Um mehr Antigen in-vivo zu exprimieren und damit eine stärkere Immunantwort auszulösen, die sich in einem wirksamen und dauerhaften Schutz vor der FeLV-Infektion zeigt, wurden die Wildtyp Sequenzen von "gag" und "env" optimiert. Unter Optimierung soll die Kodon-Anpassung, auch als "Codon-Usage-Optimization" bezeichnet, verstanden werden.

- Jede Aminosäure kann durch mehrere Kodons verschlüsselt werden. Die Häufigkeit, mit der die einzelnen Kodons während der Transkription abgelesen werden, variiert sehr stark zwischen Viren, Bakterien und Vertebraten. Dementsprechend variiert auch die Häufigkeit der entsprechenden tRNAs in der Zelle. Virale Genome haben zum Teil eine von der Wirtszelle abweichende Kodon-Nutzungsfrequenz, was wahrscheinlich ein Element der Expressionskontrolle der Viren ist. Durch Adaption der Sequenz an das wirtsspezifische Kodon-Nutzungsmuster können diese viralen Steuermechanismen unterlaufen sowie die Expression von Antigenen erheblich gesteigert werden.

- Deshalb war das Ziel der Experimente, durch Umschreibung der viralen Sequenzen in Sequenzen, die eine für Vertebratengenome optimale Kodon-Nutzung repräsentieren, eine viel stärkere Expression der Antigene zu erreichen. Dazu wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt, die die Synthese dieser optimierten DNA-Sequenz aus Oligonukleotiden ermöglichte.

- Die synthetischen Sequenzen wurden in Plasmide inseriert, in E.coli vervielfältigt, zur Kontrolle sequenziert und anschließend in Zellen einer Katzenzelllinie transfiziert, um die Expression der kodierten Proteine zu testen.

- Der Nachweis der Expression der Antigene wurde mit Hilfe von Westernblots geführt.

- Der Nachweis der Expression der Proteine durch die FeLV-Wildtyp Sequenzen (WT) von "env" und "gag" erfolgte mit Hilfe des Westernblots. Durch Immunpräzipitation konnte "env" ebenso wie "gag" nur durch sehr schwache Banden nachgewiesen werden. Überraschenderweise war dies auch für die kodon-optimierten "env"-Sequenzen der Fall. Nur bei "gag" führte die Kodon-Optimierung zu einer deutlich verbesserten Expression, wie Fig. 1 belegt. Nach Überprüfung zahlreicher anderer Hypothesen, die die mangelhafte Expression der synthetischen

Gene erklären sollten, wurden die synthetische "env" Sequenz auf durch bioinformatorisch vorhergesagte Spleißsignale (splice-sites) überprüft. Eine Reihe der vom verwendeten Programm vorhergesagten Spleißsignale wurde durch Punktmutation beseitigt, um die Hypothese zu verifizieren, daß das Auftreten solcher Strukturen die Expression der Gene im Zusammenhang mit dem verwendeten Promoter behindere. Es gelang überraschenderweise durch diese Maßnahme, "env" im Westernblot als starke Proteinbande nachzuweisen (s. Fig. 2). Die erfindungsgemäßen synthetischen Antigensequenzen zeigen durch die kräftigen Banden die erfolgreiche und verstärkte Expression der Antigene.

Es wird generell ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke eines Expressionssystems und der resultierenden Stärke der Immunantwort vermutet, wenn auch zahlreiche Befunde nahelegen, dass weder ein linearer Zusammenhang besteht, noch zwingend jede Behandlung mit Expressionsvektoren Immunität in der gewünschten Stärke nach sich zieht (Wherry et al., Journal of Immunology 2002, 168 pp 4455-4461). Deshalb wurden nach Vorliegen der *in-vitro*-Expressionsergebnisse Mäuse mit peptid-gekoppelten Expressionskonstrukten immunisiert, die für das kodonoptimierte und spleißsignal-optimierte "env" kodierten. Die Vorteile solcher peptidgekoppelten Konstrukte bei der Herbeiführung einer Immunantwort sind in den Schriften (EP 0941 318B und DE 101 56 678A) ausführlich erläutert. Zur Klärung der immunologischen Bedeutung des p15 Proteins des "env" bei der Auslösung einer Immunantwort wurden beide erfindungsgemäße für "env" kodierende Sequenzen eingesetzt (Seq.ID 7, 8, sowie 9 und 10). Die Seren der immunisierten Mäuse wurde auf spezifische Antikörper gegen das FeLVirusprotein "env" mittels Westernblot untersucht. Anhand der Antikörperlevel nach der Zweitimmunisierung in Woche 4 ist erkennbar, dass die synthetischen Konstrukte auch *in-vivo* zu einer starken Stimulation der Antikörperbildung führen. Im Vergleich zeigten fünf von sechs Mäuse der Gruppe 4 eine starke Immunantwort auf die erfindungsgemäße Antigensequenz, wohingegen der WT (Gruppe 1) zum Auslösen einer schwachen Antikörperantwort bei nur zwei von sechs Tieren führte (s. Fig. 3).

Als DNA-Expressionskonstrukte können Plasmide eingesetzt werden, bevorzugt werden aber erfindungsgemäß minimalistische immunologisch definierte Genexpressionskonstrukte verwendet. Dabei handelt es sich um lineare, kovalent

geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen. Diese kovalent geschlossenen minimalistische DNA-Konstrukte werden im folgenden als Midge Vektoren bezeichnet (MIDGE: MINIMALISTIC 5 IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTOR); vgl. EP 0 941 318 B1. Die Midge-Konstrukte haben den Vorteil, daß mit ihnen auf Strukturen verzichtet werden kann, die für deren medizinische Wirkung nicht essentiell sind, was die Nachteile der herkömmlichen Genfählen vermeidet.

Zur Transfektion können biologische, chemische und/oder physikalische Methoden 10 eingesetzt werden, die zum Stand der Technik gehören, beispielsweise Transfektion mittels ballistischem Transfer. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Transfektion mittels intradermaler Injektion durch Spritzen oder nadelfreier Injektionsgeräte.

Weitere vorteilhafte Methoden sind die biologischen Transfektionsmethoden wie der 15 peptidgekoppelte Gentransfer. Hierbei beispielsweise wird ein DNA-Expressionkonstrukt, das für mindestens die erfindungsgemäße "env" und mindestens die erfindungsgemäße "gag" Sequenz des FeLV kodiert, kovalent mit einem Oligopeptid verbunden, welches vorzugsweise die Kern-Lokalisierungssequenz (Nuclear Localization Signal = NLS) aus dem Simian Virus 20 SV-40 ist.

Nach den positiven Ergebnissen im Mausexperiment wurden Katzen mit den Expressionskonstrukten immunisiert und auf ihren Antikörperstatus untersucht.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen und der Beschreibung. Die überraschende Wirkung des 25- erfindungsgemäßen Arzneimittels (als Impfstoff zur FeLV Therapie), sowie das erfindungsmäßige Verfahren wird anhand der Figuren und Ausführungsbeispiele deutlich. Dabei bedeuten:

Midge-NLS-FeLVenvgp85(-spleiß) NLS-gekoppelter Midgevektor kodierend für die
kodon-u. spleißsignal.optimierte "env"-
Sequenz mit p15 (gp85)

Midge-NLS-FeLVenvgp70(-spleiß) NLS-gekoppelter Midgevektor kodierend für die kodon-u. spleißsignal optimierte "env"-Sequenz ohne p15 (gp70)

Midge-NLS-WT

5

mAK gegen gp70

monoklonaler Antikörper gegen gp70

Positivkontrolle

Impfstoff Leucogen

Puffer

PBS, Negativkontrolle

Das beigefügte Sequenzprotokoll gibt folgende Sequenzen wieder:

	<u>Seq. ID</u>	<u>Sequenzname/-beschreibung</u>
	1	DNA-Sequenz des Wildtyps des "env"-Gens
	2	DNA-Sequenz des Wildtyps des "gag"-Gens
	3	Proteinsequenz des Wildtyps des "env"-Gens
	4	Proteinsequenz des Wildtyps des "gag"-Gens
15	5	DNA-Sequenz des kodon-optimierten "gag"-Gens
	6	Proteinsequenz des kodon-optimierten "gag"-Gens
	7	DNA-Sequenz des kodon -u. spleißsignal optimierten "env"-Gens (gp85)
	8	DNA-Sequenz des kodon -u. spleißsignal optimierten "env"-Gens (gp70)
	9	Proteinsequenz des kodon -u. spleißsignal optimierten "env"-Gens (gp85)
20	10	Proteinsequenz des kodon -u. spleißsignal optimierten "env"-Gens (gp70)

Es zeigt:

Fig.1: in-vitro Expressionsvergleich des WT des "gag"-Proteins und des kodon optimierten "gag"-Proteins. Aufgetragen sind Katzenzelllysate, die zuvor mit folgenden Konstrukten transfiziert wurden:

25

Spur 1 u. 2: für "gag"-WT kodierende Expressionsvektoren

Spur 3: für kodon-optimiertes "gag" kodierende Expressionsvektoren

Spur 4: nichtinfizierte Katzenzellen, Negativkontrolle

Spur 6: mit Virus infizierte Katzenzellen, Positivkontrolle

Spur 7: Boa-Proteinmarker

Die Expression durch den WT führt zu sehr schwachen Proteinbanden (1 u.2), wohingegen eine starke Expression durch die erfindungsgemäße Sequenz erreicht wird (3). Zum Vergleich dienen infizierte Katzenzellen (6).

Fig.2: in-vitro Expressionsvergleich des WT des "env"-Gens und der kodon-
5 u. spleißsignaloptimierten "env"-Sequenz (gp85). Aufgetragen sind
Katzenzelllysate, die zuvor mit folgenden Konstrukten transfiziert wurden:

- Spur 1: Boa-Proteinmärker
- Spur 2: nichtinfizierte Katzenzellen, Negativkontrolle
- Spur 3: mit Virus infizierte Katzenzellen, Positivkontrolle
- 10 Spur 5: mit Virus infizierte Katzenzellen, Positivkontrolle
- Spur 6: nichtinfizierte Katzenzellen, Negativkontrolle
- Spur 7: weitere Negativkontrolle zum spezifischen "env"-Nachweis
- 15 Spur 9: für kodon- u. spleißsignaloptimiertes FeLVenvgp85(-spleiß)
kodierende Expressionsvektoren
- Spur 13: für kodonoptimiertes FeLVenvgp70(+spleiß) kodierende
Expressionsvektoren
- Spur 15: für "env"-WT kodierende Expressionsvektoren

Der WT führt zu keiner sichtbaren Proteinbande (15). Dagegen führt die kodonoptimierte Sequenz (13) zu einer schwachen, jedoch die kodon-
20 u. spleißsignal optimierte Sequenz des "env"-Proteins (9) zu einer starken
Proteinbande.

Fig.3: in-vivo Ergebnisse nach Immunisierung von Mäusen mit für "env"-
kodierenden Expressionskonstrukten. Antikörperbestimmung erfolgte in
Woche 4 nach der Zweitimmunisierung. In Gruppe 3 (Immunisierung mit
erfindungsgemäßer gp85-Sequenz) sind 3 von 6 Mäuseseren
25 antikörperpositiv, in Gruppe 4 (Immunisierung mit erfindungsgemäßer gp70-
Sequenz) 5 Seren stark positiv, 1 schwach positiv. Dagegen zeigen die mit
dem WT immunisierten Tiere der Gruppe 5 nur in zwei Fällen sehr schwache
positive Antikörpersignale. Der Versuch zeigt, dass die optimierten
Sequenzen auch in-vivo zu einer deutlich verstärkten Antikörperbildung
30 gegenüber dem WT führen und bestätigt die Ergebnisse der in-vitro
Experimente.

Beispiel 1: Wildtyp (WT)-Sequenzen

Die Wildtyp-Sequenzen der ausgewählten Antigene wurden aus dem Blut infizierter Katzen gewonnen. Die DNA-Sequenz für "env" WT ist in Seq. ID 1, für "gag" WT in Seq. ID 2 wiedergegeben. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen in Seq. ID 3 ("env") und Seq.ID 4 ("gag").

5 Primer für "gag" WT:

Zur Beseitigung von zwei Eco 31I Schnittstellen wurden 3 PCR mit folgenden Mutationsprimern durchgeführt:

- gag-mut1-rneu: AATTAAGAGCTCCACGTCTCCCCCGCTAACAGCAACTGGCG
 10 gag-mut2-l:
 AATTAAGAGCTCCAGGTCTCCGGGGCTCCGCGGGGCTGCAAGACG
 gag-mut3-r:
 AATTAAGAGCTCCACGTCTCCTCCCTTGTGTATATCTTTCTGC
 gag-mut4-l:
 15 AATTAAGAGCTCCAGGTCTCCGGAAACCCCAGAGGAAAGGAAAGAAAG

Nach Ligation der drei erhaltenen Sequenzen wurde eine PCR mit den Primern:

- Felvgag-l:
 CGGATAAGGTACCATGGGCCAAACTATAACTACC
 Felvgag-r:
 20 TTCTCAGAGCTTAGAGGAGAGTGGAGTTGGCGGGT
 durchgeführt.

Primer für "env" WT:

- envl : CGGATAAGGTACCATGGCCAATCCTAGTCCACC
 envr : AGTTCTCAGAGCTTAGGCTGTTCAAGGAGGGCTT

25 **Beispiel 2: Kodonoptimierung**

Aus der Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) wurde die Kodon Benutzungstabelle für Katzen herausgesucht. Für jede Aminosäure der zwei WT-Sequenzen wurde das Kodon, das am häufigsten für diese Aminosäure kodiert, verwendet. Dabei gab es folgende Einschränkungen:

Wenn eine Aminosäure mehr als 3mal nacheinander folgte, wurde ab der vierten Aminosäure das zweithäufigste Kodon verwendet. Dadurch sollte die plötzliche extreme Abnahme der tRNA vermieden werden und die Effektivität der Translation gesichert werden.

- 5 Um unkontrollierte immunstimulatorische Effekte auszuschließen, wurden Sequenzen mit einem C und einem darauf folgenden G vermieden.

Zur Vermeidung von Schnittstellen von Eco 31I, KpnI und SacI wurden alle Sequenzen der Basenfolge GAGCTC, GGTACC, GGTCTC und GAGACC durch Wahl alternativer, ebenfalls häufig benutzter, Kodons entfernt.

10 **Beispiel 3: Klonierung von FeLVenv**

Die Oligonukleotide wurde mit einer Länge zwischen 18 und 28 Basen bestellt (TipMolbio). Insgesamt wurden 51 Oligonukleotide durch Annealing und Ligation miteinander verbunden. Der Überhang betrug 4 Basen. Es wurde darauf geachtet, daß die Überhänge nur einmal vorkamen und nicht palindromisch waren. Jedes

15 einzelne Oligonukleotid wurde mit Strang und Gegenstrang hybridisiert, indem die beiden einzelnen Oligonukleotide (Strand und Gegenstrang) mit Kinasepuffer versetzt auf ca. 80°C erhitzt wurden und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Danach wurde ATP und Polynukleotidkinase (PNK) zugegeben und die Oligonukleotide wurden für eine Stunde phosphoryliert. Danach wurden im

20 ersten Schritt jeweils benachbarte Oligonukleotide zusammengegeben und ligiert (Oligonukleotid 1+2, Oligonukleotid 3+4). Nach 1 h Ligation wurde ein Aliquot von dem Ligationansatz der Oligonukleotide 1+2 und ein Aliquot vom Ligationsansatz 3+4 genommen und zusammengegeben. Ein Aliquot des letzten Ligationansatzes wurde genommen und eine PCR mit flankierenden Primern durchgeführt. Entstand

25 ein PCR mit der richtigen erwarteten Länge, wurde es mit TA-Cloning in den TOPO Vektor pCR 2.1 zwischenklonierte und die Sequenz kontrolliert. Dies erfolgte analog für die anderen Fragmente des kompletten Gens. 4 Fragmente wurden erhalten. Die einzelnen Fragmente wurden aus dem zwischenklonierten Plasmid mit Eco RI ausgeschnitten und dann nach Verdau mit Eco 31I mit Ligase ligiert. Das gesamte

30 Ligationsprodukt richtiger Länge wurde mit Bam HI und Sac I verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor nach Gelextraktion in pMCV1.4 kloniert. Anschließend wurde die Sequenz durch Sequenzierung kontrolliert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-FeLVenv genannt.

Primer für die 4 zusammengesetzten Fragmente:

Fragment 1:

linker Primer: ATATTGGATCCCATGCCAACCCCTCCC

rechter Primer: ATTATGGTCTCCTGCTGCTTCTGTCTGTGG

5 **Fragment 2:**

linker Primer: TAATAGGTCTCCAGCAGCAGACCTACCCCT

rechter Primer: TAATAGGTCTCTGTGAACAGGGCAATGGGTCA

Fragment 3:

linker Primer: TATTGGTCTCTCACAGTGCCAGGCAGGTGTC

10 rechter Primer: TATTAGGTCTCAGCTGTGCTGGGGGTGG

Fragment 4:

linker Primer: AATAAGGTCTCCAAGCTGACCATCTCTGAGGTGT

rechter Primer: ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTCCAGC

gesamte Sequenz:

15 linker Primer: ATATTGGATCCCATGCCAACCCCTCCC

rechter Primer: ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTCCAGC

Beispiel 4: Klonierungsstrategie für LeadFeLVenv

Zur erfolgreichen Prozessierung des "env" Proteins wurde eine Signalsequenz

(Leader Sequenz) vor die kodonoptimierte "env" Sequenz kloniert. Diese

20 Signalsequenz wurde aus insgesamt 8 ODN, mit einer Länge zwischen 22-30 bp, durch Annealing und Ligation hergestellt. Aus dem letzten Ligationsschritt wurde eine PCR zur Amplifizierung der Leadersequenz durchgeführt.

Primer für die gesamte Signalsequenz:

linker Primer: ATTGCCGGTACCATGGAGTCCCCAACCCACC

25 rechter Primer: ATCAGAGGTCTCCATGCCAATGTCAATGGTGAAC

Am 3'-Ende des PCR-Produktes wurde eine Eco31I Erkennungssequenz generiert, die nach Verdau einen Überhang erzeugt, der revers komplementär zu dem am 5'-Ende nach gleichem Verdau erzeugten Überhang des folgenden PCR-Produktes ist.

PCR für FeLVenv:

Dabei wurde am 5'-Ende der Sequenz eine Eco31I Erkennungssequenz generiert.

Verwendete Primer:

linker Primer: GATCTGGGTCTCCATGGCCAACCCCTC

- 5 rechter Primer: ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTCCAGC

Nach Verdau der beiden PCR-Produkte mit Eco31I wurden diese gereinigt und miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in eine PCR eingesetzt, bei der eine Erkennungssequenz für KpnI am 5'-Ende sowie eine für SacI am 3'-Ende generiert wurden.

10 **Verwendete Primer:**

linker Primer: ATTGCCGGTACCATGGAGTCCCCACCCACC

rechter Primer: ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTCCAGC

Das PCR-Produkt wurde mit KpnI und SacI verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde 15 pMCV1.4-LeadFeLVenv genannt.

Beispiel 5: Klonierungsstrategie für LeadFeLVenvgp85

Es wurde das gesamte "env" Polyprotein bestehend aus gp70 und p15 kloniert.

Dazu wurde mittels PCR aus dem Plasmid pMCV1.4-FeLVenvp15 die p15 WT Sequenz amplifiziert und hinter die Sequenz des o.a. pMCV1.4-LeadFeLVenv

- 20 kloniert.

Bei der Amplifizierung des p15 wurde am 5'-Ende eine Eco31I Erkennungssequenz generiert.

1. PCR:

Verwendete Primer:

- 25 linker Primer: AATTATGGTCTCGCA~~G~~TTCAGACA~~A~~CTACAA~~A~~TGGC

rechter Primer: AATTATGAGCTCTCAGGGC~~T~~GT~~C~~AGGGTC

2.PCR:

Die Sequenz von LeadFeLVenv wurde amplifiziert. Dabei wurde am 3'-Ende eine Eco31I Erkennungssequenz generiert.

Verwendete Primer:

5 linker Primer: AATTATGGTACCATGGAGTCCCCCACCC

rechter Primer: TATAATGGTCTCAACTGGGCTGTTCCAGCAGGGC

Nach Verdau der beiden PCR-Produkte mit Eco31I wurden diese miteinander ligiert.

Das Ligationsprodukt wurde in eine PCR mit folgenden Primern eingesetzt:

linker Primer: AATTATGGTACCATGGAGTCCCCCACCC

10 rechter Primer: AATTATGAGCTCTCAGGGCCTGTCAGGGTC

Dabei wurde am 5'-Ende eine KpnI Erkennungssequenz, am 3'-Ende eine SacI Erkennungssequenz generiert. Nach Verdau des PCR-Produktes mit KpnI und SacI wurde dieses in den ebenso geschnittenen pMCV1.4 ligiert und kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4—LeadFeLVenvgp85 genannt.

15 Beispiel 6: Spleiß-Signal Optimierung des LeadFeLVenvgp85 (-spleiß):

Die DNA-Sequenz des LeadFeLVenv wurde unter http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html auf mögliche Spleiß-Signalsequenzen (splice-sites) überprüft. Zwischen den Basen 100 und 140 wurde eine splice-site mit einer 97% Wahrscheinlichkeit erkannt. Nach Austausch der Base 119 (von A nach G = AS-Austausch von Gln nach Arg) wurde keine potentielle splice-site mehr erkannt (untere Grenze = 40% Wahrscheinlichkeit). Die Erzeugung und Klonierung der mutierten Sequenz wurden folgendermaßen durchgeführt:

PCR zur Erzeugung der mutierten Sequenz:

25 Zunächst wurde mittels PCR ein Fragment (1), bestehend aus den Basen 1 – 123 des LeadsynFeLVenv amplifiziert. Der verwendete vorwärts-Primer generiert am 5'-Ende des PCR-Produktes die Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes KpnI.

Die Sequenz des rückwärts-Primer wurde so gewählt, daß das PCR-Produkt die Mutation (Base 119=G) aufweist. Zusätzlich generiert die PCR die Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes Eco31I-Site am 3'-Ende des PCR-

Produktes. Grundsätzlich erzeugt Eco31I einen 4 Basen 5'-Überhang der Basen 2-5 downstream der Erkennungssequenz.

- Der 4 Basen 5'-Überhang, der nach Verdau des PCR-Produktes mit Eco31I am 3'-Ende des Fragment 1 entsteht, entspricht den Basen 120 – 123 der Sequenz des
- 5 LeadFeLVenv: Diese Sequenz wiederum entspricht dem Überhang, der auch entsteht, wenn LeadFeLVenv mit dem Restriktionsenzym BgLI geschnitten wird, da die Basen 119. – 124 des LeadFeLVenv die Erkennungssequenz von BgLI darstellen.
- Aus dem Konstrukt pMCV1.4-LeadFeLVenv wird somit zunächst mittels KpnI und
- 10 BgLI die Basen 1 – 123 ausgeschnitten.
- Nach Verdau des PCR-Produktes Fragment 1(mit Mutation der Base 119 = G) mit KpnI und Eco31I kann dieses in den mit KpnI und BgLI geschnittenen und gereinigten pMCV1.4-LeadFeLVenv ligiert und kloniert werden. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-FeLVenvgp70 (-spleiß) genannt.
- 15 verwendete Primer:
- linker Primer: 5'-ATTGCCGGTACCATGGAGTCCCCCACCCACC
- rechter Primer: 5'-ATATTAGGTCTCAGATCCGGGGGGGGAGGG
- Analog dazu wurde das PCR-Produkt Fragment 1 in den mit KpnI und BgLI geschnittenen und gereinigten pMCV1.4-LeadFeLVenvgp85(-spleiß) ligiert und
- 20 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-FeLVenvgp85(-spleiß) genannt.

Beispiel 7 Klonierungsstrategie für FeLVgag:

- Die Klonierung von FeLVgag erfolgte entsprechend der unter 3 beschriebenen Vorgehensweise. Die Sequenz wurde über Oligonukleotide, die zunächst zu drei einzelnen Fragmenten annealt und ligiert wurden, hergestellt. Die Sequenz wurde
- 25 aus insgesamt 2 x 31 Oligonukleotiden (Vorwärts- und Rückwärtsstrang) zusammengesetzt. Die Fragmente wurden als Template in eine PCR eingesetzt und mit folgenden Primern amplifiziert:

Fragment 1:

- linker Primer: ATATTGGTCTCAGGAGAGGGACAAGAAGAG
- 30 rechter Primer: AATATGGTCTCTCAGCCTGCTGGCGATGGGGC

Fragment 2:

linker Primer: ATTATGGTCTCTGCACCTGAGGCTGTACAGGC

rechter Primer: AATATGGTCTCGGTGCTCCCTGCCGGCGGGGGTGCA

Fragment 3:

5 linker Primer: ATTATGGTCTCTGCACCTGAGGCTGTACAGGC

rechter Primer: AATATGGTCTCTCCTCCTGCCTCTGC

Primer für das gesamte Fragment:

linker Primer: ATATTGGTCTCAGGAGAGGGACAAGAAGAG

rechter Primer: AATATGGTCTCTCCTCCTGCCTCTGC

10 Fragment 1, 2 und 3 wurden in den TOPO-Vektor pCR 2.1. zwischenkloniert; anschließend mit Eco 31I verdaut und extrahiert. Das Ligationsprodukt aus 1, 2 und 3 wurde mit KpnI und SacI verdaut und in pMCV 1.4 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pCMV1.4-FeLVgag genannt.

Beispiel 7 Transfektion der Zellen, Expressionsnachweis:

15 Feline Zellen der f3201 Zelllinie wurden mit den Plasmiden, pMCV1.4-FeLVenvgp85(-spleiß), pMCV1.4-FeLVenvgp70(-spleiß), FeLVgag und den WT enthaltenen Plasmiden pMOK für "env" und "gag" mittels Elektroporation bei 250 V und 1050 µF transfiziert.

20 Der Nachweis der exprimierten Proteine wurde mit der Western Blot Methode geführt. Für den Nachweis dienten monoklonale Mausantikörper. Positiv-Kontrolle: mit FeLV A infizierte Zellen der f3201 Zelllinie.

Beispiel 8 Herstellung von peptidgekoppelten Midge:

Die Plasmide pMCV1.4-FeLVenvgp85(-spleiß), pMCV1.4-FeLVenvgp70(-spleiß) und pMCV1.4-FeLVgag wurden mit dem Restriktionsenzym Eco31I über Nacht bei 25 37°C vollständig verdaut. Durch den Restriktionsverdau wurden zwei DNA-Fragmente erzeugt. Das eine bestand aus dem Kanamycin-Resistenzgen, sowie anderen zu Propagierung des Plasmides in Bakterien notwendigen Sequenzen. Das andere Fragment bestand aus den Sequenzen die Bestandteil der Midge-DNA werden sollten: enhanced CMV-Promotor, chimäres Intron, der entsprechenden Gensequenz und der Polyadenylierungssequenz aus SV 40. Mittels des Enzyms 30

T4-DNA-Ligase wurden die 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotide (TIBMolBiol, Berlin) 5' -PH- GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC -3' und 5' PH- AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' in Anwesenheit des Restriktionsenzymes Eco31 I über Nacht bei 37°C an das die Midge-DNA bildende DNA Fragment ligiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch an Nukleinsäuren wurde mit dem Enzym T7-DNA-Polymerase behandelt. Die Midge-DNA wurde durch Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt (vgl. EP 0 941 318 B1)

10 Herstellung der peptid-gekoppelten ODN:

das NLS-Peptid PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-d(GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC, wobei xT amminomodifizierte Thyminbase mit C₂ – Amminolinker bezeichnet) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl₂, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS-gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der Midge-NLS Konstrukte wie zuvor beschrieben eingesetzt.

Beispiel 9: Antikörperfest in Mäusen:

Es wurden fünf Impfgruppen zu je sechs BALB/c Mäusen gebildet. Grundantigen in allen Gruppen (mit Ausnahme der Kontrollgruppen) waren die optimierten Sequenzen des "env" Proteins mit und ohne immunomodulierendem Protein p15. Die kodierende Sequenz und der Zytomegalo-Virus Promotor (CMV), der der Sequenz vorangestellt ist, werden als lineare Doppelstrangmoleküle entsprechend Bsp.8 verwendet. Als Kontrollen dienten PBS Puffer, herkömmlicher Impfstoff (Leucogen) und der WT des "env" Proteins. Nach der Erstimmunisierung (50 µg DNA, 1mg/ml, i.d.) erfolgte eine Zweitimmunisierung (Boost) am 15. Tag. Blutentnahmen erfolgten am 14., 28. Und 42. Tag. Die Blutproben wurden auf spezifische Antikörper gegen "env" getestet.

Gr.	Mäuse	Verwendetes Antigen	Fragestellung
1	6	Leucogen	Positivkontrolle
2	6	PBS-Puffer	Negativkontrolle
3	6	FeLVenvgp85(-spleiß)	Antikörper bestimmen
4	6	FeLVenvgp70(-spleiß)	Antikörper bestimmen
5	6	WT "env"	Positivkontrolle

Beispiel 10: Immunisierung von Katzen

Zum Testen, ob die synthetischen Sequenzen in der Lage sind, in Katzen eine humorale und zelluläre Immunantwort hervorzurufen, wurde folgendes Impfregime
5 formuliert:

Tabelle 1: Zusammensetzung der Impfgruppen

Gr.	Katzen	Verwendetes Antigen	Fragestellung
1	5	FeLVenvgp85(-spleiß) FeLVgag	Antikörper- u. Zytokinstatus bestimmen
2	5	FeLVenvgp70(-spleiß) FeLVgag	Antikörper- u. Zytokinstatus bestimmen, Vergleich zu Gruppe 1
3	2	PBS Puffer	Negativkontrolle
4	3	Leucogen	Positivkontrolle

Die Katzen der ersten beiden Gruppen werden zweimal mit einer Gesamtmenge von jeweils 600µg DNA gelöst in PBS Puffer immunisiert. Die peptidgekoppelten Expressionskonstrukte werden per intradermaler Injektion in den Nacken verabreicht. Die Immunantwort wird über die Dauer von 12 Wochen verfolgt. Die Zweitimmunisierung erfolgt in Woche 4: Durch Bestimmung des Zytokinstatus aus den wöchentlich genommenen Blutproben, sollen Aussagen über die Richtung der Immunantwort (Th1, Th2) getroffen werden. Dabei wurde IL-4 als Indikator einer TH2; IL-2 und Interferon-gamma als Indikator einer vorwiegend TH1 gerichteten

Immunantwort (Th1, Th2) getroffen werden. Dabei wurde IL-4 als Indikator einer TH2; IL-2 und Interferon-gamma als Indikator einer vorwiegend TH1 gerichteten Immunantwort bestimmt. Der Impfstoff Leucogen enthält rekombinantes "env" Protein und wird als Positivkontrolle eingesetzt.

- 5 Antikörper gegen die eingesetzten Antigene wurden mittels Westernblot und ELISA-Verfahren bestimmt.

Die Menge der mRNA der Zytokine IL-2, IL-4 sowie Interferon-gamma wurde mittels real-time PCR Verfahren bestimmt.

Patentansprüche

1. DNA-Expressionskonstrukt zur Expression von Genprodukten des Feline Leukosevirus (FeLV) in Katzenzellen, bestehend aus einer in Feliden operablen Promotorsequenz und mindestens einer ein Strukturprotein und/oder ein Membranprotein des FeLV kodierenden Nukleotidsequenz, wobei die kodierende Sequenz des FeLV kodonoptimiert ist und keine offenen oder versteckten Splice-Donor und/oder Akzeptorsequenzen aufweist.
- 5 2. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt die für das gag-Strukturprotein kodierende kodonoptimierte Nukleotidsequenz enthält (Seq.ID 5).
- 10 3. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt die für das env-gp70-Membranprotein kodierende kodon- u. spleißsignal optimierte Nukleotidsequenz enthält (Seq.ID 8).
- 15 4. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt die für das env-gp70-Membranprotein kodierende kodon- u. spleißsignal optimierte Nukleotidsequenz enthält, die um die für das immunogene Protein p15 kodierende Nukleotidsequenz verlängert ist (Seq.ID 7).
- 20 5. DNA-Expressionskonstrukt nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Struktur- und/oder Membranproteine ganz oder teilweise durch die entsprechenden Nukleotidsequenzen kodiert werden.
6. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Expressionskonstrukt ein Plasmid ist.
- 25 7. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich

aufweisen und wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenucléotiden verknüpft sind, und wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promoters und einer Terminatorsequenz besteht.

- 5 8. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Expressionskonstrukt mit einem oder mehreren Peptiden kovalent verknüpft ist.
- 10 9. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 8, wobei das Peptid aus 3 bis 30 Aminosäuren besteht, von denen mindestens die Hälfte basische Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin kommen.
- 15 10. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 9, wobei das Peptid die Aminosäuresequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) aufweist.
11. Arzneimittel, insbesondere eine Vakzine, zur Erzeugung einer präventiven und/oder therapeutischen Immunität bei Feliden, insbesondere der Katze, enthaltend das DNA-Expressionskonstrukt nach den Ansprüchen 1 bis 10.

110

Seq.ID: 1 DNA-Sequenz des WT „env“

ATGGCCAATCCTAGTCCACCCCCAATATATAATGTAACCTGGGTAAATAACCAATGTACAA
ACTAACACCCAAGCTAACGCCACCTCTATGTTAGGAACCTAACCGATGCCTACCCCTACC
CTACATGTTACTTATGTGACCTAGTGGGAGACACCTGGGAACCTATAGTCCTAAACCCA
ACCAATGTAACACAGGGCACGTTACTCCTCTAAAATATGGATGTAACACTACAGAT
AGAAAAAAACAGCAACAGACATACCCCTTTACGTCTGCCCCGACATGCCCTCGTTG
GGGCCAAAGGGAACACATTGTGGAGGGCACAAAGATGGGTTTGTCGGCATGGGATGT
GAGACCACCGGAGAAGCTGGTGGAAAGCCCACCTCCTCATGGGACTATACACAGTAAA
AGAGGGAGTAGTCAGGACAATAGCTGTGAGGGAAAATGCAACCCCCCTGGTTGCAGTTC
ACCCAGAAGGGAAAGACAAGCCTTTGGGACGGACCTAACAGATGTGGGATTGCGACTATAC
CGTACAGGATATGACCTATCGCTTATTACCGGTGTCCCGGCAGGTATCAACCATTACG
CCGCCTCAGGCAATGGGACCAAACCTAGTCTTACCTGATCAAAACCCCCATCCGACAA
TCTCAAACAGGGTCCAAAGTGGCGACCCAGAGGCCAAACGAATGAAAGCGCCCCAAGG
TCTGTTGCCCAACACCATTGGTCCAAACGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAT
TTAGTACAAGGGACATACCTAGCCTTAAATGCCACCGACCCCAACAAAACAAAGACTGT
TGGCTCTGCCTGGTTCTGACCACCCATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACTAC
AGCAACCAAACAAACCCCCCCCCATCCTGCCTATCTACTCCGCAACACAAACTAACTATA
TCTGAAGTATCAGGGCAAGGAATGTGCATAGGGACTGTTCTAAAACCCACCAGGCTTG
TGCAATAAGACACAACAGGGACATACAGGGCGCACTATCTAGCCGCCAACGGCACC
TATTGGGCCTGTAACACTGGACTCACCCATGCATTTCCATGGCGGTGCTCAATTGGACC
TCTGATTGGTCTTAATCGAATTATGGCCAGAGTGACTTACCATCAACCGAATAT
GTGTACACACATTGCCAAGCTGTCAGGTTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACGGTT
GCCCTTATGTTGGGAGGACTACTGTAGGGGCATAGCCGCGGGGTCGGAACAGGGACT
AAAGCCCTCCTGAAACAGCCTAA

Seq.ID: 2 DNA-Sequenz des WT „gag“

ATGGGCCAAACTATAACTACCCCTTGAGCCTCACCCCAACCACTGGTCTGAGGTTAG
GCACGGGCCGTAACTAGGGTGTGAAGTCGGAAAAAGAAATGGATTACACTGTGTGAA
GCCGAATGGGTAATGATGAATGTAGGTTGGCCCCGAGAAGGAACCTTCACCATTGACAAT
ATTCACAGGTCGAGGAGAGAACCTCGCCCCGGGGCATATGGACACCCAGATCAAATC
CCTTATATTACACGTTGGAGATCCCTAGCCACAGACCCCCCTCCATGGGTTGCCCATTC
CTACCCCCCTCTAAAGCATCCCAGGACAGATCCTCCCGAGCCTCTTCGGCGAACCTCTT
GCGCCGCAACCTCTTCCCCCAGCCGCTCTAACCCGTTCTCCCTTAATTGATCTCTAACAGAA
CCCAAGGCGCCTGTATTACCAACCTTCTCCCTTAATTGATCTCTAACAGAA
GAGCCACCTCCCTATCCTGGGGTACGGCCAACACCGCCGTAGGGCTAGAACCCCCA
ACTGCCCTCCCCATTGCCATCCGGCTGCGAGAACGACGAGAAAATCCAGCTGAGAAATCT
CAAGCCCTCCCCCTTAAGGGAAAGACCCAAACACAGACCCCAGTACTGGCCATTCTCGGCC
TCTGACCTGTACAATTGGAAATTGACATAACCCCCCTTCTCCCAAGGACCCAGTGGCCCTA
ACTAACCTAACATTGAGTCCATTAGTGACACATCAGCCAACCTGGGACGACTGCCAACAG
CTCTTACAGGCTCTCTGACGGCAGAGGAGAGACAAAGGGTCTCTTGAGGCCGAAAG
CAAGTTCCAGGCGAGGACGGACGGCAACCCAGCTGCCAATGTCGTTGACGAGGCTTTC
CCCTTGACCCGTCCTAACACTGGATTGGTACGCCGGCAGGTAGGGAGCACCTACGCCTT
TATGCCAGTTGCTGTTAGCGGGCTCCGGGGCTGCAAGACGCCACTAACATTGGCA
CAGGTAAAGCAAGTTGTACAAGGGAAAGAGGAAACGCCAGCCTCATTCTAGAAAGATTA
AAAGAGGCTTACAGAATGTAACTCCCTATGACCTGAGGACCCAGGGCAGGCTGCTAGT
GTTATCCTGTCCTTATCTACCAAGTCTAGGCCGGACATAAGAAATAAGTTACAAAGGCTA
GAAGGCCTACAGGGGTTCACACTGTCTGATTGCTAAAGAGGCAGAAAGATATACAAC
AAAAGGGAAACCCAGAGGAAAGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCAGGAAGAAAGAGAT
AAAAAGGCCATAAGGAGATGACTAAAGTTCTGGCCACAGTAGTTGCTCAGAATAGAGAT
AAGGATAGAGGGAAAGTAAACTGGGAGATCAAAGGAAATACCTCTGGGAAAGACCAG
TGTGCCTATTGCAAGGAAAGGGACATTGGGTTCGCGATTGCCGAAACGACCCCGGAAG
AAACCCGCCAACTCCACTCTCCTCTAA

Seq. ID: 3 Proteinsequenz des WT „env“

MANPSPPQIYNVTWITNVQTNTQANATSMLGTLTADYPTLHVDLCDLVGDTWEPIVLNP
TNVKHGARYSSSKYGCKTDRKKQQQTYPFYVCPGHAPSLGPKGTHCGGAQDGFCAAWGC
ETTGEAWWKPTSSWDYITVKRGSSQDNSCEGKCNPLVLQFTQKGRQASWDGPKMWGLRLY
RTGYDPIALFTVSQRQVSTITPPQAMGPNLVLPDQKPPSRQSQTGSKVATQRPQTNESAPR
SVAPTTMGPKRIGTGDRLLINLVQGTYLALNATDPNKTDCWLCLVSRPPYYEGIAILGNY
SNQTNPPPSCLSTPQHKLTISEVSGQGMCI GTPKTHQALCNKTQQGHTGAHYLAAPNGT
YWACNTGLTPCISMAVLNWTSDFCVLIELWPRVTYHQPEYVYTHFAKAVRFRREPISLT
ALMLGGLTVGGLAAGVGTGTKALLETA

Seq. ID: 4 Proteininsequenz des WT „gag“

MGQTITPLSLTLNHWSEVQARARNQGVEVRKKWITLCEAEWMMNVGWPREGTFTIDN
ISQVEERIFAPGPYGHPDQIPYITTWRSLATDPPPWRPFLPPPKHPRTDPPPEPLSPQPL
APQPSSPHPVLYPVLPKPDPPLKAPVLPPNPSSPLIDLTEEPPPYPGGHGPTPPSGPRTP
TASPIAIRLRERRENPAEKSQLPLREDPNRNPQYWPFSASDLYNWKLHNPPFSQDPVAL
TNLIESILVTHQPTWDDCQQQLQALLTAEERQRVLLEARAKQVPGEDGRPTQLPNVVDEAF
PLTRPNWDFCTPAAGREHLRLYRQLLLAGLRGAAARRPTNLAQVKQVQGKEETPASFLERL
KEAYRMYTPYDPEDPGQAASVILSFYQSSPDIRNKLQRLEGHQGFTLSDLLKEAEKIYN
KRETPEEREERLWQRQEERDKKRHKEMTKVLATVVAQN RDKDRGESKLGDQRKIPPLGKDQ
CAYCKEGHWVRDCPKRPRKKPANSTLL

5/10

Seq ID: 5 DNA-Sequenz des FeLVgag

ATGGGCCAGACCATCACCAACCCCCCTGAGCCTGACCCTGAACCCTGGAGCGAGGTGCAG
GCCAGGGCCAGGAACCAGGGCGTGGAGGTGAGGAAGAAGAAGTGGATCACCTGTGCGAG
GCCGAGTGGGTGATGATGAACGTGGCTGGCCCAGGGAGGGCACCTCACCATCGACAAAC
ATCAGCCAGGTGGAGGGAGAGGATCTCGCCCCCGGCCCTACGGCCACCCGACCAGATC
CCCTACATCACCAACCTGGAGGGAGCTGGCCACCGAACCCCCCCCCCTGGGTGAGGCCCTC
CTGCCCCCCCCCAAGCACCCAGGACCGAACCCCCCGAGCCCCCTGAGCCCCAGCCCCTG
GCCCGCCAGCCCAGCGCCCCCCCCTACAGCAGCCTGTACCCCGTGTGCCAAGCCGAC
CCCCCAAGGCCCCCGTGTGCCCTAACCCCAGCAGCCCCCTGATCGACCTGCTGACC
GAGGAGCCCCCCCCCTACCCCGGCCACGGCCCCACCCCCCCCCAGCGGCCAGGACC
CCCACCGCCAGCCCCATGCCAGCAGGCTGAGGGAGAGGAGGGAGAACCCGCCGAGAAG
AGCCAGGCCCTGCCCTGAGGGAGGGACCCAAACAACAGGCCCTAGTACTGGCCCTTCAGC
GCCAGCGACCTGTACAACACTGGAAGCTGCACAAACCCCCCTTCAGCCAGGACCCGTGGC
CTGACCAACCTGATCGAGAGCATCCTGGTGACCCACCGCCACCTGGGACGACTGCCAG
CAGCTGCTGCAGGCCCTGCTGACCGCCGAGGAGAGGAGGGCAGAGGGTGCTGCTGGAGGCCAGG
AAGCAGGTGCCCGCGAGGACGGCAGGCCACCCAGCTGCCAACGTGGTGGACGAGGCC
TTCCCCCTGACCAAGGCCAACACTGGGACTTCTGCACCCCCCGCCGGCAGGGAGCACCTGAGG
CTGTACAGGCAGCTGCTGCTGGCCGGCCTGAGGGCGCCAGGAGGGCCCACCAACCTG
GCCAGGGTAAGCAGGTGGTGCAAGGGCAAGGAGGGAGACACCCGCCAGCTCCTGGAGAGG
CTGAAGGAGGCCCTACAGGATGTACACCCCCCTACGACCCCGAGGACCCCGCCAGGCCACC
AGCGTGATCCTGAGCTTCATCTACCAAGAGCAGCCCCGACATCAGGAACAAGCTGCAGAGG
CTGGAGGGCCTGCAGGGCTCACCCCTGAGCGACCTGCTGAAGGAGGCCAGAAGATCTAC
ACAAGAGGGAGACACCCGAGGAGGGAGGGAGGGAGGCTGTGGCAGAGGCCAGGAGGAGG
GACAAGAAGAGGCACAAGGAGAGATGACCAAGGTGCTGGCCACCGTGGTGGCCAGAACAGG
GACAAGGACAGGGCGAGAGCAAGCTGGCGACCAGAGGAAGATCCCCCTGGCAAGGAC
CAGTGCGCCTACTGCAAGGAGAAGGGCACTGGTGAGGGACTGCCCAAGAGGCCAGG
AAGAAGCCCCCAACAGCACCCCTGCTGTAG

8 00 00 00

6/10

Seq. ID: 6 Proteinsequenz FeLVgag

MGQTITPLSLTLNHWSEVQARARNQGVEVRKKKWLCEAEWVMMNVGPREGFTIDN
ISQVEÉRIFAPGPYGHPDQIPYITTWRSLATDPPPWWVRPFLPPPKHPRTDPPPEPLSPQL
APQPSAPPISL^YPVLPKDPPKAPVLPPNPSSPLIDLLEEEPPPYPGGHGPTPPSGPRT
PTASPIASRLRERRENPAEKSQALPLREDPNRNPQYWPFSA^{DLY}NWKLHNPPFSQDPVA
LTNLIESILVTHQPTWDDCQQLLQALLTAEERQRVLLEARKQVPGEDGRPTQLPNVVDEA
FPLTRPNWDFCTPAGREHLRLYRQLLL^{AG}LRGAARRPTNLAQVKQVVQGKEETPASFLER
LKEAYRMYTPYDPEDPGQATSVILSF^{IY}QSSPDIRNKLQRLEG^LQGFTLSDLLKEAEKIY
NKRETPEEREERLWQRQEERDKKRHKEMTKVLATVVAQNRDKDRGESKLGDQRKIP^LGKD
QCAYCKEK^GHVVRDCPKRPRKKPANSTLL

Seq.ID: 7 DNA-Sequenz des FeLVenvgp85(-spleiß)

ATGGAGTCCCCCACCCACCCAAAGCCCTCCAAGGACAAGACCCGTCTGGAACATGGTG
TTCTGGTGGGCATCCTGTTACCAATTGACATTGGCATGGCAAACCCCTCCCCCCCCGG
ATCTACAATGTGACCTGGGTGATCACCAATGTGCAGACCAACACCCAGGCCATGCCACC
TCTATGCTGGGCACCCCTGACAGATGCATACCCACCCCTGCATGTGGACCTGTGTGACCTG
GTGGGGGACACCTGGGAGCCCATTCCGCTGAACCCACCAATGTGAAGCATGGGGCCAGG
TACTCCTCCTCCAAGTATGGCTGCAAGACACAGACAGGAAGAAGCAGCAGCAGACCTAC
CCCTTCTATGTGTGCCCTGGCCATGCCCTCCCTGGGCCCCAAGGGCACCCACTGTGGG
GGGGCCCAGGATGGCTTCTGTGCTGCCTGGGGCTGTGAAACCACAGGGGAGGCCTGGTGG
AAGCCCACCTCCTGGGACTACATCACAGTGAAGAGGGCTCCAGGACAACCTCC
TGTGAGGGCAAGTGCACACCCCTGGTGCAGTTACCCAGAAGGGCAGGCAGGCCTCC
TGGGATGGCCCCAAGATGTGGGCCTGAGGCTGTACAGGACAGGCTATGACCCATTGCC
CTGTTCACAGTGTCCAGGCAGGTGTCCACCATACCCCCCCCCAGGCCATGGGCCCCAAC
CTGGTGCTGCCTGACCAGAAGCCCCCTCCAGGCAGTCCCAGACAGGCTCCAAGGTGGCC
ACCCAGAGGCCCAAGACCAATGAGTCTGCCCTCAGGTCTGTGGCCCCACACCACATGGG
CCCAAGAGGATTGGCACAGGGGACAGGCTGATCACACCTGGTCAGGGCACCTACCTGGCC
CTGAATGCCACAGACCCCAACAAGACCAAGGACTGCTGGCTGTGCCTGGTGTCCAGGCC
CCCTACTATGAGGGCATTGCCATCCTGGCAACTACTCCAACCAGACCAACCCCCCCCC
TCCTGCCTGTCCACCCCCCAGCACAGCTGACCATCTCTGAGGTGTCTGGCCAGGGCATG
TGCATTGGCACAGTGCCTAACAGACCCACCAGGCCCTGTGCAACAAGACCCAGCAGGGCAC
ACAGGGGCCACTACCTGGCTGTCCCCATGGCACCTACTGGGCCCTGCAACACAGGCCCTG
ACCCCTGCACTCCATGGCTGTGCTGAACCTCTGACTTCTGTGTGCTGATTGAG
CTGTGGCCCAGGGTGCACCTACCAAGGCCCTGAGTATGTGTACACCCACTTGCAAGGCT
GTGAGGTTCAAGGAGGGAGCCATCTCCCTGACAGTGGCCCTGATGCTGGGGGCTGACA
GTGGGGGGCATTGCTGCTGGGGTGGGCACAGGCACCAAGGCCCTGCTGGAAACAGGCCAG
TTCAGACAACATAAAATGCCATGCACACAGACATCCAGGCCCTAGAAGAGTCAGTTAGC
GCTTAGAAAATCCCTGACCTCCCTCTGAAGTAGTCCTACAAAACAGACGAGGCCCTA
GATATTCTATTCCTACAAGAGGGAGGACTCTGTGCCGCATTAAAAGAAGAATGTTTTT
TATGCAGATCACACCGGATTAGTCCGAGATAATATGGCTAAATTAAAGAGAAAGATTAAAA
CAGCGGCAACAACGTTGACTCCCAACAGGGATGGTTGAAGGATGGTTCAACAAGTCC
CCCTGGCTTACAACCCCTAATTCTCTATTATGGGCCCTGCTTATCCTGCTCCTAATT
CTCCTCTCGGCCCATGCATCCTAACCGATTGGTGCATTGTAACAGATAAGCAATACGATCCGGAC
CGACCATGA

Seq.ID: 8 DNA-Sequenz des FeLVenvgp70(-spleiß)

ATGGAGTCCCCCACCCACCCCAAGGCCCTCCAAGGACAAGACCCGTCTGGAACATGGTG
TTCTGGTGGCATCCTGTTACCAATTGACATTGGCATGGCAACCCCTCCCCCCCCCGG
ATCTACAATGTGACCTGGGTGATCACCAATGTGCAGACCCAACACCCAGGCAATGCCACC
TCTATGCTGGCACCCTGACAGATGCATACCCACCCCTGCATGTGGACCTGTGACCTG
GTGGGGACACCTGGAGCCCATTCCGCTGAACCCACCAATGTGAAGCATGGGCCAGG
TACTCCTCCTCCAAGTATGGCTGCAAGACCACAGACAGGAAGAACGCAGCAGCACCTAC
CCCTCTATGTGTGCCCTGGCCATGCCCTCCCTGGGCCAAGGGCACCCACTGTGGG
GGGGCCCAAGGATGGCTTCTGTGCTGCCCTGGGCTGTGAAACACAGGGGAGGCCCTGGTGG
AAGCCCACCTCCTGGACTACATCACAGTGAAGAGGGCTCTCCAGGACAACCTCC
TGTGAGGGCAAGTGAACCCCTGGTGCAGTTACCCAGAAGGGCAGGCAGGCCTCC
TGGGATGGCCCCAAGATGTGGGCCTGAGGCTGTACAGGACAGGCTATGACCCATTGCC
CTGTTACAGTGTCCAGGCAGGTGTCACCATCACCCCCCCCCAGGCCATGGGCCAAC
CTGGTGCCTGACCAGAACGCCCCCTCCAGGCAGTCCCAGACAGGCTCCAAGGTGGC
ACCCAGAGGCCAGACCAATGAGTCTGCCCTAGGTCTGTGGCCCCCACCACCATGGC
CCCAAGAGGATTGGCACAGGGACAGGCTGATCAACCTGGTCAGGGCACCTACCTGGC
CTGAATGCCACAGACCCAAACAAGACCAAGGACTGCTGGCTGTGCCCTGGTGCAGGCC
CCCTACTATGAGGGCATTGCCATCTGGCAACTACTCCAACAGACCAACCCCCCCCC
TCCTGCCGTCCACCCCCCAGCACAGCTGACCATCTTGAGGTGTCTGGCCAGGGCATG
TGCATTGGCACAGTGCCAAGACCCACCAGGCCCTGTGCAACAAGACCCAGCAGGGCCAC
ACAGGGGCCACTACCTGGCTGTCCCCAATGGCACCTACTGGGCCTGCAACACAGGCCTG
ACCCCTGCATCTCCATGGCTGTGTAACGGACCTCTGACTTCTGTGTGCTGATTGAG
CTGTGGCCCAGGGTGACCTACCACCGCCTGAGTATGTGTACACCCACTTGCCAAGGCT
GTGAGGTTCAAGGAGGGAGCCCATCTCCCTGACAGTGGCCCTGATGCTGGGGGCCCTGACA
GTGGGGGCATTGCTGCTGGGTGGGCACAGGCACCAAGGCCCTGCTGGAAACAGCCTGA

Seq. ID: 9 Proteinsequenz des FeLVenvgp85 (-spleiß)

MESPTHPKPSKDKTLSWNMVFLVGILFTIDIGMANPSPPRIYNVTWVITNVQTNTQANAT
SMLGTLTDAYPTLHVDLCDLVGDTWEPIPLNPTNVKHGARYSSSKYGCCKTDRKKQQQTY
PFYVCPGHAPSLGPKGTHCGGAQDGFCAWGCETTGEAWWKPTSSWDYITVKRGSSQDNS
CEGKCNPLVLQFTQKGRQASWDGPKMWGLRLYRTGYDPIALFTVSQRQVSTITPPQAMGPN
LVLPDQKPPSRQSQTGSKVATQRPQTNESAPRSVAPTTMGPKRIGTGDRLLNLVQGTYLA
LNATDPNKTAKDCWLCLVSRPPYYEGIAILGNYSNQTNPPPSCLSQHQHKLTISEVSGQGM
CIGTPKTHQALCNKTQQGHTGAHYLAVPNGTYWACNTGLTPCISMAVLNWTSDFCVLIE
LWPRVTYHQPEYVYTHFAKAVRFRREPISLTVALMLGGTVGGIAAGVGTGTKALLETAQ
FRQLQAMAHTDIQALESVSALEKSLTSLSQVNLQNRQLDILFLQEGGLCAALKEECCF
YADHTGLVRDNMAKLRRERLKQRQQQLFDSSQQGWFEGLFNKSPWLTLISSIMGPLLILLI
LLFGPCILNRLVQFVKDRISVQALVLTQQYQQIKQYDPDRP

Seq. ID: 10 Proteinsequenz des FeLVenvgp70 (-spleiß)

MESPTHPKPSKD**T**LWNMVFLVGILFTIDIGMANPSPPIYNTWVITNVQTNTQANAT
SMLGTLTDAYPTLHVDLCDLVGDTWEPIPLNPTNVKHGARYSSSKYGCKTDRKKQQQTY
PFYVCPGHAPS**L**GPKGTHCGGAQDGFCAAWGCE**T**GEAWWKP**S**WDYITVKRGSSQDNS
CEGKCNPVLQFTQKGRQASWDGP**K**MWGLRLYRTGYDPIALFTVS**R**QVSTITPPQAMGPN
LVLPDQKPPSRQSQTGSKVAT**Q**RPQTNESAPRSVAPTTM**G**PKRIGTGDR**L**INLVQGTYLA
LNATDPNKTKDCWLCLVSRPPYYEGIAILGNYSNQTNPPPSCLSTPQHKL**T**ISEVSGQGM
CIGTPKTHQALCNKTQQGHTGAHYLAVPNGTYWACNTG**L**TPCISMAVLNWTSDFCVLIE
LWPRVTYHQPEYVYTHFAKAVRFRREPISLTVALM**GG**LTGGIAAGVGTGTALLETA

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Impfstoff, welcher einen Schutz gegen Erkrankung infolge einer Lentivirusinfektion, insbesondere eine Infektion mit dem feline Leukosevirus (FeLV) induzieren vermag. Ein solcher Impfstoff enthält kodon-
5 optimierte DNA-Sequenzen, die für Strukturproteine und daß wichtigste Membranprotein des FeLV kodieren.

Fig.: 1 in-vitro Expressionsvergleich der WT und der synFeLVgag-Sequenz des FeL-Virus

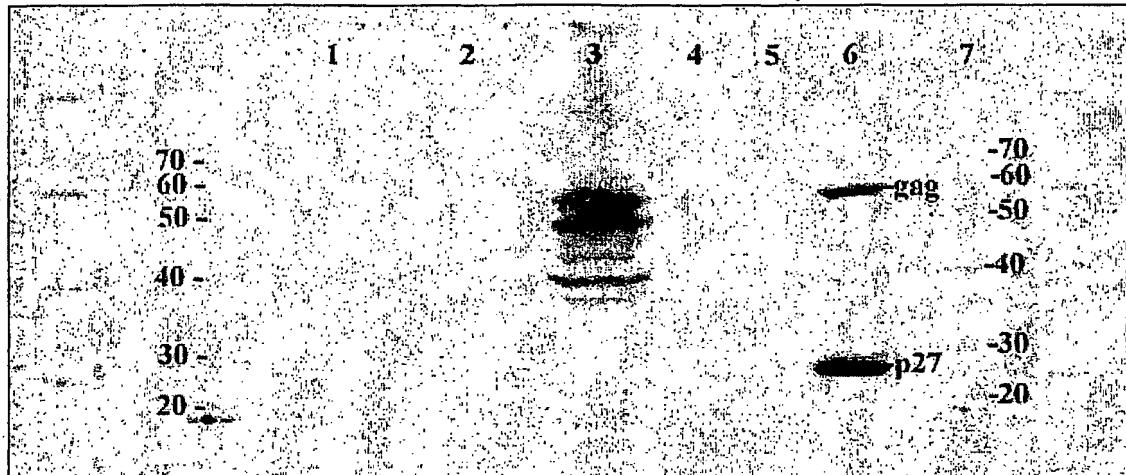


Fig.: 2 in-vitro Expressionsvergleich der WT und der FeLVenvp85-Sequenz des FeL-Virus

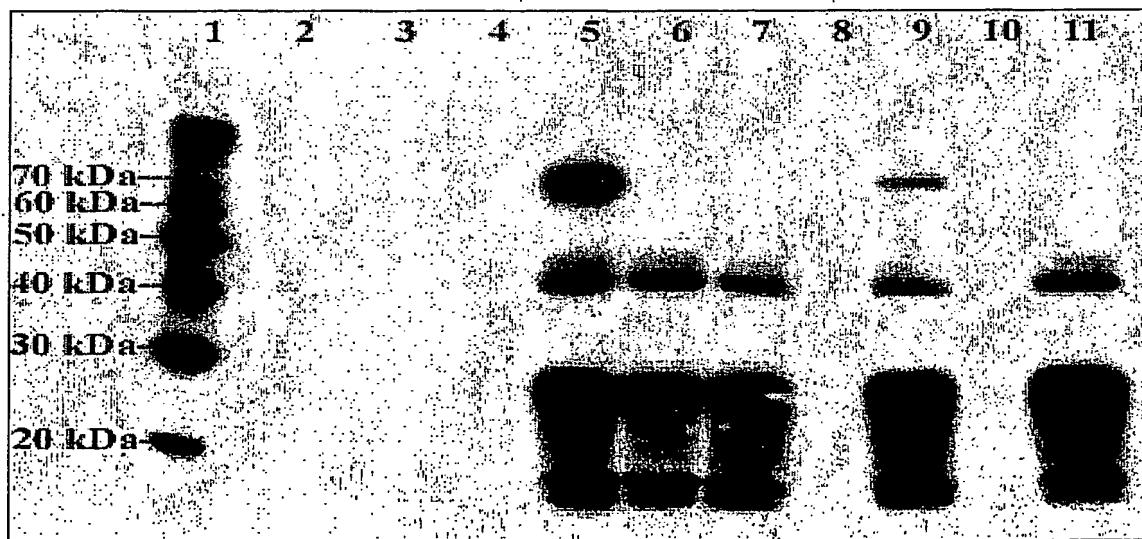
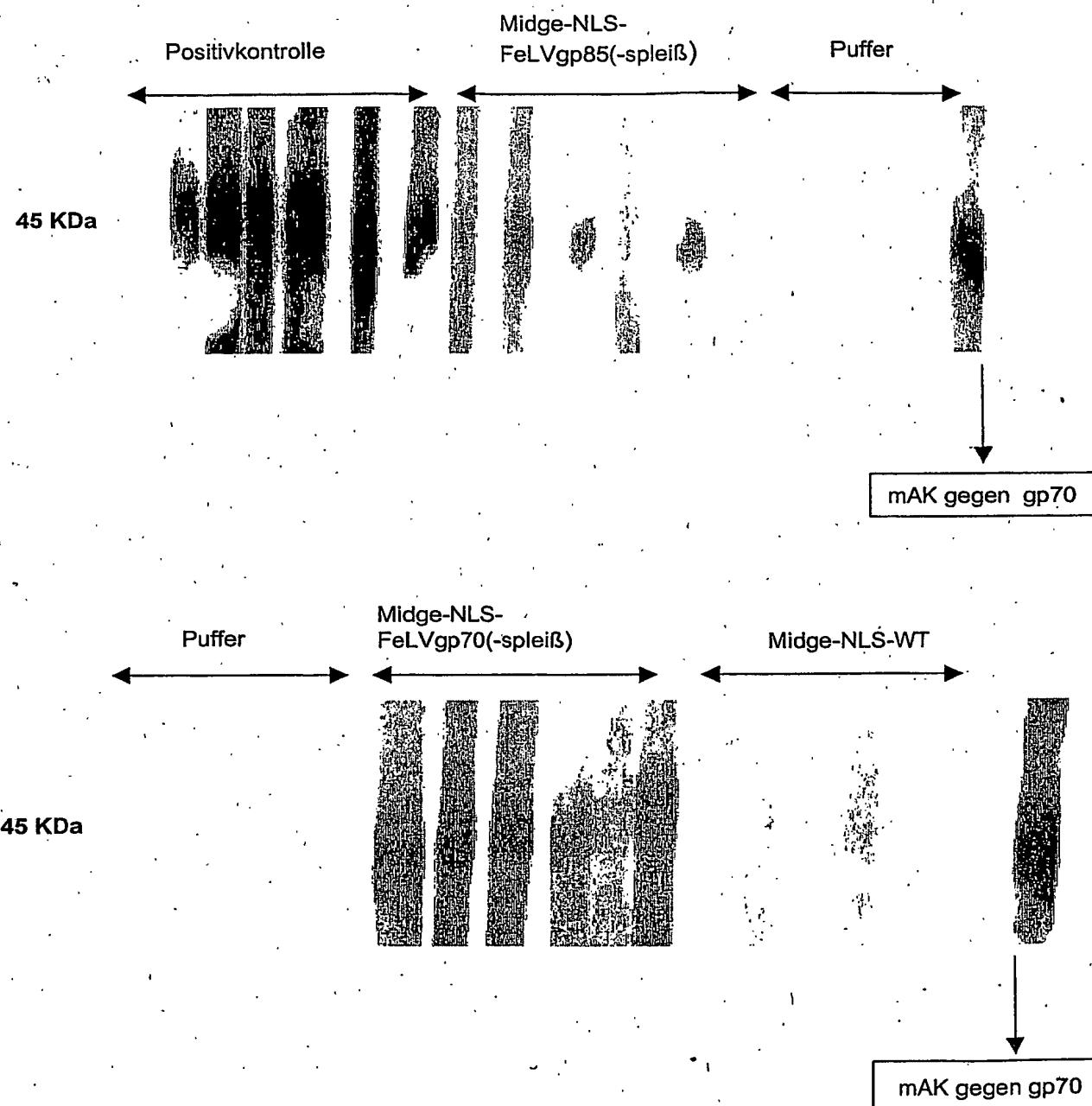


Fig.: 3 in-vivo Expression des „env“-Proteins



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.